(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2006-121948
(P2006-121948A)
(43)公開日　平成18年5月18日(2006.5.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
A61K 39/205	(2006.01)	A61K	39/205		4B065
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12		4C085
C12N 7/04	(2006.01)	C12N	7/04		
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	

審査請求 未請求　請求項の数 4　ＯＬ　（全 18 頁）

(21)出願番号　特願2004-312760 (P2004-312760)
(22)出願日　平成16年10月27日 (2004.10.27)

(71)出願人　591047970
共立製薬株式会社
東京都千代田区九段南１丁目５番１０号
(74)代理人　100083806
弁理士　三好　秀和
(74)代理人　100100712
弁理士　岩▲崎▼　幸邦
(74)代理人　100087365
弁理士　栗原　彰
(74)代理人　100100929
弁理士　川又　澄雄
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤　正和
(74)代理人　100101247
弁理士　高橋　俊一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換えウイルス

(57)【要約】
【課題】マトリックスタンパク質遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスの工業スケールへの適用が可能な増殖・産生法およびその産生法に使用するウイルス感受性細胞、ならびに組換え狂犬病ウイルスからなる安全なワクチンを提供することを目的とする。
【解決手段】本発明は、ウイルス粒子の成熟に不可欠なマトリックスタンパク質を必要時に発現させることが可能なウイルス産生用感受性細胞を構築し、そのウイルス産生用感受性細胞を使用することにより、マトリックスタンパク質遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを工業スケールで増殖・産生させる方法を提供するものである。加えて、本発明は、外来性マトリックスタンパク質を補足しない限り接種動物体内でウイルス複製しないことから安全で、かつ高い免疫原性を保持した生の狂犬病ウイルスワクチンを提供する。更に、本発明は、注射接種法に加えて経口経鼻接種法でも狂犬病予防に有効なウイルス中和抗体の産生を促すことができる組換え狂犬病ウイルスワクチンを提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
リバースジェネティックスの技法により作出したマトリックスタンパク質（Ｍタンパク質）遺伝子を欠損し高度に弱毒化した組換え狂犬病ウイルスを、Ｍタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現・産生することが可能な狂犬病ウイルス感受性細胞を使用して感染・増殖させる、Ｍタンパク質遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルス粒子の増殖・産生法。
【請求項２】
請求項１に記載のウイルス粒子増殖・産生法に使用する狂犬病ウイルス感受性細胞であって、前記ウイルス感受性細胞が、マトリックスタンパク質（Mタンパク質）遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスについて、Mタンパク質の恒常的かつ細胞構成的な発現を人為的に制御できる細胞。
【請求項３】
請求項１に記載の増殖・産生法による組換え狂犬病ウイルス粒子を含むワクチン。
【請求項４】
請求項３に記載のワクチンであって、注射接種用、経口接種用および経鼻接種用のワクチン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、リバースジェネティックスの技法により作出したマトリックスタンパク質遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを工業スケールで産生することを可能にする産生法に関するものであり、並びに、安全で、かつ高い免疫原性を保持した生の狂犬病ウイルスワクチンに関する。
【背景技術】
【０００２】
狂犬病は、狂犬病ウイルスを保有するイヌ、ネコ、コウモリなどの野生動物に咬まれたり、引っ掻かれたりして発症する人獣共通感染症の１つであり、ワクチン接種により効果的に予防できるウイルス性疾患の１つである。それにも関わらず、１８８５年のパスツールによる最初のワクチン開発から１００年以上経過した現在でもなお、ヒトおよび動物における狂犬病の発生が数多く報告されており、ごく一部の国においてこのウイルス感染症が根絶されているに過ぎない。世界保健機関（WHO）によると、狂犬病が原因で死亡する人の数は、世界中で毎年４０，０００から６０，０００人にのぼると推計されており（http://www.who.int/GlobalAtlas/InteractiveMap/rmm/default.asp）、特にアジアやアフリカなどの発展途上国において多く報告されている。また近年、狂犬病が一度根絶された地域においても、アライグマやコウモリなどの野生動物を宿主とする狂犬病の存在が確認されている。
【０００３】
従来、狂犬病に対しては不活化ウイルスワクチンが用いられているが、不活化ウイルスワクチン、特に組織培養から得られる不活化ウイルスワクチンは、多量のウイルス抗原を必要とするために製造コストが高く、狂犬病の発生が多く報告されているアジアやアフリカなどの発展途上国においては特に、ヒトおよび動物に使用するには高価なワクチンである。
【０００４】
また、狂犬病ウイルスに感染した動物の神経組織由来の不活化ウイルスワクチン（例えばSemple rabies vaccine）は、前記組織培養から得られる不活化ウイルスワクチンに比較して、より低いコストで製造することができるが、接種された動物において自己免疫性脳脊髄炎を引き起こすなどの重篤な副作用のおそれがあり、安全性に難点がある。
【０００５】
更に、不活化ウイルスワクチンの接種は注射接種によるため注射針の付いた注射器が必要で、注射器および注射針の不足が深刻な国々においては、ワクチン接種を広範に行うの

を妨げる一因ともなっており、ニードルフリー（needle-free）接種の実現が望まれるところである。

【０００６】

一方、弱毒化狂犬病ウイルスワクチンは、不活化ウイルスワクチンに比較してより低いコストで製造することができ、またウイルスが不活化されていないため、経口接種などの注射器を使わない方法によってもウイルス中和抗体の産生を促すことが可能である。しかしながら、弱毒化ウイルスワクチンを接種された動物においては、残存するウイルス毒性、あるいは動物の体内においてウイルス増殖の際に起こる病原性復帰突然変異により、狂犬病を発症することもあり、これが通常弱毒化ウイルスワクチンではなく不活化ウイルスワクチンが用いられる主たる要因となっている。

【０００７】

Conzelmannは、狂犬病ウイルスSAD B19株の核タンパク質（Nタンパク質）、リン酸化タンパク質（Pタンパク質）、RNA依存性RNAポリメラーゼタンパク質（Lタンパク質）をそれぞれ発現することが可能なヘルパープラスミドベクターをコトランスフェクション（co-transfection）し、更に、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼを発現することが可能な組換えワクシニアウイルスを感染させたBHK-21（baby hamster kidney）細胞に狂犬病ウイルスの全長cDNAを組込んだプラスミドベクターをトランスフェクションで導入することにより、成熟した組換え狂犬病ウイルスを作出することができるとしている（米国特許6,033,886号）。

【０００８】

また、全長のウイルスcDNAゲノムの代わりにマトリックスタンパク質（Mタンパク質）遺伝子（M遺伝子）を欠損させたウイルスcDNAゲノムを用いる場合、上記の系に加えてMタンパク質をコードするヘルパープラスミドベクターをコトランスフェクションすることにより、Mタンパク質が補足された、成熟した組換えM遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出することができると予想している（米国特許6,033,886号）。

【０００９】

しかしながら、実際には、Mタンパク質発現ヘルパープラスミドベクターを導入した細胞系にM遺伝子欠損狂犬病ウイルスcDNAゲノムを組込んだプラスミドベクターを導入しても、外来性のMタンパク質が補足されたM遺伝子欠損狂犬病ウイルスのウイルス粒子は得られず、Conzelmannも含めて、M遺伝子欠損狂犬病ウイルスのウイルス粒子の産生に実際に成功した例は未だない。

【００１０】

このようにM遺伝子欠損狂犬病ウイルスのウイルス粒子が得られない原因の詳細は不明であるが、平均的な効率が30%程度と言われるトランスフェクションの効率の低さやそれぞれのトランスフェクションによる各組換えタンパク質の発現効率の低さの影響が大きいと考えられる。

【００１１】

更には、上記のようなリバースジェネティックスの系でM遺伝子欠損狂犬病ウイルスを調製する時、外来的に補足するMタンパク質が細胞毒性を示し、宿主とするMタンパク質発現細胞の増殖が妨げられることも、M遺伝子欠損狂犬病ウイルスの産生効率を低下させる一因となっている。

【００１２】

一方、上記のようなM遺伝子欠損ウイルスを調製するリバースジェネティックスの系におけるMタンパク質の発現効率の低さ、Mタンパク質の示す細胞毒性およびそれに伴う細胞増殖性の低下については、これらの問題を解決することなしに、工業スケールでM遺伝子欠損狂犬病ウイルスを産生することは不可能である。

【００１３】

また、一般的に、実験室レベルで使用する少量のM遺伝子欠損狂犬病ウイルスを調製する際には、上記のConzelmann（米国特許6,033,886号）やSchnellらのリバースジェネティックス法（M. J. Schnellら, 1994, EMBO Journal, 13: 4195-4203）が適用できる。しか

しながら、M遺伝子欠損狂犬病ウイルスを工業レベルで大量に産生させる際には、外来タンパク質発現法としてのプラスミドベクターのトランスフェクションや組換えワクシニアウイルスの感染などは煩雑であり、かつ、これらの方法によるウイルス産生効率が不安定であることから、これらの方法は工業レベルでの製造法として適用できない。

【特許文献１】米国特許6,033,886号

【非特許文献１】M. J. Schnellら, 1994, EMBO Journal, 13: 4195-4203

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１４】

本発明は、高度に弱毒化したM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを作出し、更に、作出したM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを増殖・産生させる方法、およびその増殖・産生法に用いるウイルス産生用細胞を提供し、加えて、産生させた組換え狂犬病ウイルス粒子を含む安全かつ高免疫原性のワクチンを提供することを目的とする。

【００１５】

本発明は、更に、注射接種法に加えて経鼻経口接種法でも狂犬病予防に有効なウイルス中和抗体の産生を促すことができる組換え狂犬病ウイルスワクチンを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１６】

本発明は、リバースジェネティックスの技法を駆使してM遺伝子を欠損した組換え狂犬病ウイルスを作出し、更に、そのM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスの工業スケールでの産生を可能にすることを特徴とする。

【００１７】

すなわち本発明は、リバースジェネティックスの技法により作出したマトリックスタンパク質（Mタンパク質）遺伝子を欠損し高度に弱毒化した組換え狂犬病ウイルスを、Mタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現・産生することが可能な狂犬病ウイルス感受性細胞を使用して感染・増殖させる、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルス粒子の増殖・産生法を提供するものである。

【００１８】

また本発明は、前記のウイルス粒子増殖・産生法に使用する狂犬病ウイルス感受性細胞が、Mタンパク質発現能を欠いたM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスの成熟に必要なMタンパク質を補足する（complementation）細胞であって、更に、そのMタンパク質の恒常的かつ細胞構成的な発現（constitutive expression）を人為的に制御でき、Mタンパク質による細胞毒性を極力低下させることができる細胞を提供する。

【００１９】

本発明はまた、リバースジェネティックスの技法により作出したM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを用いることにより、外来性Mタンパク質を補足しない限り接種動物体内で子孫ウイルスを複製しないことから安全で、かつ高い免疫原性を保持した生の狂犬病ウイルスワクチンを提供することを特徴とする。

【００２０】

本発明は更に、本発明の産生法により得られる組換え狂犬病ウイルスを含むワクチン、特に注射接種用、経口接種用および経鼻接種用ワクチンを提供することを特徴とする。

【発明の効果】

【００２１】

本発明は、ウイルス粒子の成熟に不可欠であるが細胞毒性を示す狂犬病ウイルスMタンパク質を必要時、すなわち成熟ウイルス粒子を産生する時にのみ発現させることが可能な細胞を作出し、その細胞にリバースジェネティックスの技法を駆使することにより作出したM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを感染させることで、外来性のMタンパク質が補足（complementation）されたM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを工業スケールで大量に増殖・産生することができる。

【００２２】
本発明では、M遺伝子を欠損させた組換えウイルスを用いることにより、ウイルスが生体に感染はするが複製能を有しない（replication-incompetent）ことから安全であり、かつ、Mタンパク質以外のウイルス抗原を産生することが可能なことから、抗原発現能を欠く不活化ウイルスに比べより高い免疫原性を保持した、生の狂犬病ウイルスのワクチンを提供することができる。
【００２３】
本発明の組換え狂犬病ウイルスワクチンは、ウイルスが不活化されていないため、注射接種に加えて経鼻接種および経口接種によってもウイルス中和抗体の産生を促すことが可能である。したがって、ワクチン接種に注射器および注射針が必要ないニードルフリー（needle-free）接種が実現され、また、野生動物への効果的かつ安全な投与を行うことができる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２４】
狂犬病ウイルス（Rabies virus, RV）は、ラブドウイルスファミリー（Rhabdoviridae）に属する一本鎖のマイナス鎖RNAゲノムを有するウイルスであり、ヒトを含む哺乳動物において重篤な神経疾患や死を引き起こす。
【００２５】
狂犬病ウイルスは、およそ１２，０００塩基から成る非分節型のマイナス鎖RNAウイルスであって、図１に示すように、Nタンパク質（核タンパク質）、Pタンパク質（リン酸化タンパク質）、Mタンパク質（マトリックスタンパク質）、Gタンパク質（外被タンパク質）、Lタンパク質（RNA依存性RNAポリメラーゼタンパク質）の５つの構造タンパク質からなっている。MタンパクおよびGタンパク質は、宿主細胞膜由来の脂質二重層と共にウイルスの裏打ち構造（マトリックス）およびエンベロープをそれぞれ形成するものであり、また、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質およびウイルスゲノムRNAは、成熟ウイルス粒子（ビリオン）においてウイルスのエンベロープによりコートされるリボ核タンパク質複合体（ribonucleoprotein complex）を構成している。
【００２６】
狂犬病ウイルスのMタンパク質は、上述のように、宿主細胞膜由来の脂質二重層と共にウイルスのマトリックスを形成するものであり、ウイルスの粒子形成および出芽に重要な役割を担っている。すなわち、M遺伝子を欠損したウイルス粒子は、細胞に感染した場合に、抗原性の高いウイルスタンパク質であるGタンパク質などは産生するが粒子形成に必須なMタンパク質を産生し得ないため、仮に外来的にMタンパク質が補足（complementation）されて成熟した完全粒子になったとしても、ウイルス複製能を欠き、子孫ウイルスを産生しない。
【００２７】
換言すれば、M遺伝子欠損ウイルス粒子は、感染性を保持するがウイルス複製能を欠き、またそのために病原性を有しない、不完全粒子である。また、M遺伝子欠損ウイルス粒子は、生体内でウイルス抗原タンパク質を産生するので、生体内でウイルス抗原タンパク質を産生しない不活化ウイルスワクチンに比べて免疫効果が高い。したがって、M遺伝子欠損ウイルス粒子は、不活化ウイルスワクチンに比べ免疫効果が高く、かつ安全な狂犬病ワクチンとして応用可能であると考えられる。そこで、本発明者らは、M遺伝子を欠損し、複製能を欠いた狂犬病ウイルス粒子をリバースジェネティックスの系により作出し、更に、その複製能欠損粒子を工業スケールで大量に増殖させるために必要な、Mタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現する細胞をも樹立したものである。
【００２８】
Mタンパク質以外の他のウイルスタンパク質もまた、狂犬病ウイルスの複製およびワクチン効果の発揮のために重要な役割を担っている。すなわち、Gタンパク質は、狂犬病ウイルスに対する中和抗体などの宿主防御応答の誘導ならびに宿主細胞の受容体への結合など、狂犬病ウイルスの免疫原性や病原性において主要な役割を担っている（N. Ito ら，2

001, J. Virol. 75:9121-9128）。一方、Nタンパク質、PタンパクおよびLタンパク質は、ウイルスRNAゲノムの複製およびウイルス遺伝子の転写に必要である。

【００２９】

本明細書において“高度に弱毒化した狂犬病ウイルス”とは、それを接種した動物において如何なる病原性も示さず、例えば成体マウスおよび哺乳マウスにおいて無発病性である、安全性の高い狂犬病ウイルスを指す。本発明では、弱毒化されたウイルス株をさらにM遺伝子欠損とすることにより、複製能を消失させ、“高度に弱毒化した狂犬病ウイルス”を調製するものである。本明細書では、“高度に弱毒化した狂犬病ウイルス”を調製するために、弱毒化された株の一例としてRC-HL株を用いたが、本発明の狂犬病ウイルスはこの株に限定されるものではない。

【００３０】

RC-HL株は、弱毒化された培養細胞順化狂犬病ウイルス株の１つであって、日本においては動物用不活化狂犬病ウイルスワクチンの種ウイルスとして使われている。RC-HL株は致死性の感染を引き起こさず、例えば成体マウスにおいて大脳内接種後に発生する一過性の体重減少などの軽い症状が見られるのみである（図４A参照）。他の弱毒化株の中には、哺乳マウスの脳や神経芽腫細胞株NA細胞において数代継代することにより、より病原性の高い変異体に変換（病原性復帰突然変異）しうるものもあるが、これとは対照的に、RC-HL株は哺乳マウスの脳において22代継代した後においても安定である。

【００３１】

本発明では、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを調製するために必要なM遺伝子欠損ウイルスゲノムのcDNAを組み込んだプラスミドベクター（以下pRC-HLΔMという。）を以下のように構築した。図１にpRC-HLΔMの作出の概略図を示す。なお、図1においては、狂犬病ウイルスがマイナス鎖のRNAゲノムを有することから、cDNAゲノムの表示は左端を3'末端および右端を5'末端とした。

【００３２】

まず、通常のクローニング技術を用いて、図１に示した狂犬病ウイルスRC-HL株の全長cDNAゲノムを組み込んだプラスミドpRC-HL(+)から、P遺伝子後半とM遺伝子をコードする遺伝子領域に相当するSpe I－Sac II遺伝子断片（塩基番号1,959～3,118）を欠失させる。

【００３３】

一方、pRC-HL(+) DNAを鋳型とした一般的なPCR (polymerase chain reaction)によって、Ｐ遺伝子領域内のSpe I認識部位からP遺伝子5'末端までの遺伝子領域を、Ｐ遺伝子領域内Spe I認識部位近傍の塩基配列を含むセンスプライマーとＰ遺伝子5'末端近傍の塩基配列の5'末端にSac II認識部位を附加したアンチセンスプライマーとを用いて増幅する。

【００３４】

このように増幅した遺伝子断片は、制限酵素Spe I及びSac IIで消化した後、上述のSpe I－Sac II遺伝子断片を欠損させたpRC-HL(+)のSpe I－Sac II消化部位にT4 Ligaseを用いて連結・組み込み、M遺伝子領域だけが欠損した狂犬病ウイルスcDNAゲノムを含有するプラスミドベクターpRC-HLΔMを作出する。

【００３５】

また、このようにして作出したpRC-HLΔMを外来的にMタンパク質を補足できる系に導入することで、M遺伝子が欠損したウイルスゲノムを有する組換え狂犬病ウイルス（以下、RC-HLΔMという。）を増殖・産生させることができる。

【００３６】

上述のように作出したM遺伝子欠損狂犬病ウイルスcDNAゲノムを含有するpRC-HLΔM由来の組換えウイルスRC-HLΔMは、M遺伝子を欠損しているため、感染性を保持するが複製に必須なMタンパク質を産生できない不完全粒子であって、例えば、成体マウスおよび哺乳マウスに接種しても完全に無発病性であった（図４A、B）。このことから、RC-HLウイルスからM遺伝子を欠損させることにより、より安全なウイルスが得られることが示される。

【００３７】

また、狂犬病ウイルスを含む非分節型マイナス鎖RNAウイルスの間では、それぞれでウイルスゲノムの塩基配列が大きく異なることから、遺伝子相同組換えが起きることはなく、したがって、欠損したM遺伝子を再獲得することはない。また、RC-HLΔMを生ウイルスワクチンとして接種した動物は狂犬病ウイルスの感染を防御することができるため、RC-HLΔMが野外の狂犬病ウイルスからM遺伝子を再獲得するような遺伝子相同組換えが起こることは考えられない。したがって、RC-HLΔMが再び複製能を獲得することは考えられず、M遺伝子欠損狂犬病ウイルスRC-HLΔMが、弱毒化されたRC-HL株が本来持つ非病原性に加えて、極めて高い安全性を有することが強く示唆される。

【００３８】

本明細書において“リバースジェネティックス（reverse genetics）”とは、RNAウイルスのcDNAゲノムから人工的にウイルスを作出する遺伝子工学技術を指す。

【００３９】

本発明では、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼを恒常的に発現する狂犬病ウイルス感受性細胞に、M遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスcDNAフルゲノムを含有するプラスミドベクターpRC-HLΔM、ならびにMタンパク質発現ベクター、Nタンパク質発現ベクター、Pタンパク質発現ベクターおよびLタンパク質発現ベクターをコトランスフェクションするリバースジェネティックスの技法により、外来性Mタンパク質が補足されたM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルス（RC-HLΔM）を実際に作製することに、初めて成功した。

【００４０】

本発明では、更に、上記のリバースジェネティックスの技法を用いて得られたRC-HLΔMのビリオンをオリジナル・ストックとして、Mタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現する狂犬病ウイルス感受性のウイルス産生用細胞に感染させることにより、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスRC-HLΔMを工業的に大量増殖・製造することに、初めて成功した。

【００４１】

上記のように調製したM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスRC-HLΔMについて、親ウイルス株であるrRC-HLを比較対照として、確かにM遺伝子欠損ウイルスであるかどうか、およびその生物学的特性はどうであるかを比較検討した。

【００４２】

rRC-HL株とは、弱毒化された培養細胞順化狂犬病ウイルス株であるRC-HL株のリバースジェネティックスの技法による組換えウイルス株であり、野生型RC-HL株とほぼ同様の生物学的特性を有する感染性狂犬病ウイルスである（N. Ito ら, 2001. J. Virol. 75:9121-28）。

【００４３】

まず、上記のように調製したM遺伝子欠損狂犬病ウイルスRC-HLΔMが確かにM遺伝子欠損ウイルスであるか、Mタンパク質以外のウイルスタンパク質を産生するか否か、ならびにこのウイルスが複製し子孫ウイルスを産生するか否かは、後述のように、それぞれ逆転写PCR（RT-PCR）、間接螢光抗体法（IFA、indirect immunofluorescence assay）およびウエスタン・ブロット法により確認できる（図2A、2B、2Cおよび2D）。

【００４４】

RT-PCRは、以下のようにして行うことができる。すなわち、RC-HLΔMのウイルス・ストックからゲノムRNAを抽出し、それを鋳型として、ポジティブセンス・プライマーを用いてcDNAを合成した。次いで、このcDNAを鋳型とし、ポジティブセンス・ プライマーおよびネガティブセンス・プライマーを用いたPCRを実施する。続いて、このようにして増幅するM遺伝子近傍のcDNA断片をアガロースゲル電気泳動で解析することで、RC-HLΔMがM遺伝子を欠損したウイルスであるか否かを確認できる。上記のようなRCRを行った結果、RC-HLΔMのウイルス・ストックから増幅されたM遺伝子領域のDNA断片は450 bp (base pairs、塩基対)であり、このウイルスがM遺伝子を欠損していることが確認された（図2B）。

【００４５】

RC-HLΔMが複製し子孫ウイルスを産生するか否かは、RC-HLΔMを感染させた細胞をIFAで螢光標識することにより調べることができる（N. Minamotoら, 1994, Microbiol.Immun

ol. 38:449-55）。すなわち、まず、RC-HLΔMおよびrRC-HLをマウス神経芽腫細胞株NA細胞に接種して培養した後、各々の感染細胞を固定する。続いて、固定した細胞に抗Nタンパク質モノクローナル抗体（N-MAb）を作用させ、螢光標識した二次抗体との反応で感染細胞を螢光標識した後に螢光顕微鏡観察下でウイルス抗原を検出することにより、RC-HLΔMが複製し子孫ウイルスを産生しているか否かを調べることができる。このようなIFAを行った結果、RC-HLΔMを感染させたNA細胞では、感染したRC-HLΔM由来の僅かのNタンパク質しか検出されず、このウイルスが感染性を保持しているものの複製能を持たないことが確認された（図2D）。

【００４６】

また、RC-HLΔMが複製能を有するか否かは、組織培養プレートの各培養ウェルに単層に増殖させたBHK細胞を用いた一般的なフォーカス・アッセイでRC-HLΔMのウイルス力価を測定することにより確認することができる。このようなウイルス力価測定を行った結果、RC-HLΔMのウイルス力価は検出限界以下であり、このウイルスが複製能を有しないことが再度確認された。

【００４７】

一方、RC-HLΔMがNタンパク質あるいはMタンパク質を産生するか否かについては、抗Nタンパク質モノクローナル抗体（N-MAb）あるいは抗Mタンパク質モノクローナル抗体（M-MAb）を用いた一般的なウエスタン・ブロット法で調べることができる。すなわち、RC-HLΔMを感染させたNA細胞から調製した細胞全タンパク質を一般的なウエスタン・ブロット法で解析することで、RC-HLΔM感染細胞において、Mタンパク質やNタンパク質が産生されているか否かを調べることができる。

【００４８】

本発明において、このような方法を実施した結果、RC-HLΔMは、Mタンパク質を発現しないがNタンパク質を発現していることが明らかになり、狂犬病ウイルスワクチンとして重要な免疫原性を担うNタンパク質の発現能を保持していることが示された。また、一方で、Mタンパク質の発現が検出されなかったことから、感染後に細胞内で複製せず、生ウイルスワクチンとしての安全性を備えていることも明らかになった。

【００４９】

M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスRC-HLΔMは、前述したように、Mタンパク質発現ベクターを狂犬病ウイルス感受性細胞にトランスフェクションし、外来性のMタンパク質を発現させた細胞にRC-HLΔMを感染させることにより得ることができる。しかしながら、Mタンパク質発現ベクターによるトランスフェクションの工程にはMタンパク質の発現効率の低さや不安定さが伴い、また非常に煩雑な作業の実施が必要であり、その上、製造コストが高騰することから、ワクチン用ウイルスを工業レベルで増殖・製造する工程として適用することはできない。

【００５０】

したがって、本発明においては、工業的に用いることが可能な、RC-HLΔMを大量に生産するための産生用細胞として、Mタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現する細胞を構築する。加えて、その産生用細胞には、細胞に対して毒性を示すMタンパク質の発現を人為的に制御できるシステムも導入する。これにより、ワクチン用ウイルス、すなわちRC-HLΔMを増殖・製造する工程において、ウイルス産生用細胞にMタンパク質発現ベクターをトランスフェクションする必要がなくなり、RC-HLΔM をMタンパク質恒常発現細胞に感染させるだけで、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスRC-HLΔMを効率よく安価に増殖・製造することができる。

【００５１】

本明細書において“Mタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現（constitutive expression）する”とは、Mタンパク質を常時安定的に発現することを指す。本発明では、Mタンパク質を恒常的かつ細胞構成的に発現させることができることから、M遺伝子欠損組換えウイルスを調製するために、Mタンパク質発現ベクターをウイルス産生用細胞にトランスフェクションして細胞にMタンパク質を発現させる工程を毎回行う必要がなくなる。

【００５２】
具体的には、上記のトランスフェクション法により得られた、外来性Mタンパク質が補足されたM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスをオリジナル・ストックとしておき、外来因子（例えば薬剤など）によりMタンパク質の発現を人為的に制御することが可能なMタンパク質発現制御系を導入した細胞を用いて、当該ウイルスの工業的増殖・製造を実現する。
【００５３】
狂犬病ウイルスのMタンパク質が高い細胞毒性を有することは知られており、Mタンパク質を発現させ続けると、最終的に細胞にアポトーシスを引き起こしてしまう。このため本発明者らは、外来因子（例えば薬剤など）の添加によりMタンパク質の発現を人為的に制御することが可能な細胞系を構築し、必要時にのみMタンパク質を人為的に発現させて、Mタンパク質による細胞毒性を低減するものである。また、そのようなMタンパク質の発現を人為的に制御可能な細胞の作出・導入によって、上述のように、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスの工業レベルでの増殖・産生を実現するものである。
【００５４】
本発明では、外来因子（例えば薬剤など）の添加により制御可能なMタンパク質発現制御系の一例として、GeneSwitch（商標）システム（Invitrogen社製）を用い、合成ステロイドホルモンであるミフェプリストン（mifepriston）によりMタンパク質発現を人為的に制御可能なBHK細胞系を構築した。
【００５５】
GeneSwitchシステムは、２種類のベクター（pGene/V5-His発現ベクターとpSwitch調節ベクター）を用いて発現を強力にコントロールする系であり、インデューサーとしてミフェプリストンが存在する条件下では目的タンパク質を発現するが、ミフェプリストン非存在下では目的タンパク質を全く発現しない。すなわち、インデューサーとしてのミフェプリストン非存在下ではpSwitchから発現された調節タンパク質はpGene/V5-Hisのプロモーターと結合できず遺伝子の転写が起こらないが、ミフェプリストンを添加すると上記プロモーターと結合して調節タンパク質の立体構造が変化し、ハイブリッド調節タンパク質（ミフェプリストン／調節タンパク質複合体）がpGene/V5-HisのGal4 DNA結合部位と結合して転写が誘導されるものである。
【００５６】
狂犬病ウイルスのMタンパク質の発現をミフェプリストンの添加により誘導できる細胞は、GeneSwitchシステムの取扱説明書に記載された方法に従い、BHK細胞を用いて作出することができ、また、M遺伝子を組み込んだpGene/V5-His発現ベクターとpSwitch調節ベクターが導入された細胞は、抗生物質Zeocinに耐性を示す細胞としてクローニングできる。
【００５７】
このような方法で作出・クローニングした細胞の中から、Mタンパク質の発現を人為的に制御可能な、最も大量にRC-HLΔMを産生する細胞を選択し、BHK/RM-23細胞と名付けた。
【００５８】
BHK/RM-23細胞におけるミフェプリストン添加によるMタンパク質の発現誘導は、上記同様の一般的なウエスタン・ブロット法およびIFAにより確認できる。すなわち、ミフェプリストン存在下および非存在下で培養したBHK/RM-23細胞について、抗Mタンパク質モノクローナル抗体（M-MAb）を用いたウエスタン・ブロット法およびIFAを行い、Mタンパク質が検出できるか否かで、Mタンパク質発現の誘導を確認することができる。以上のようなウエスタン・ブロット法およびIFAを実施した結果、ミフェプリストンの添加によるBHK/RM-23細胞からの効率的なMタンパク質の発現誘導が確認された（図3A、3B）。
【００５９】
本発明のMタンパク質誘導発現システムは、前記GeneSwitchシステム（Invitrogen社製）には限定されず、例えば他の薬剤などでMタンパク質発現を制御できるすべての系を含む。
【００６０】

RC-HLΔMの免疫原性は、1.0×10^5フォーカス形成単位（FFU）のRC-HLΔMおよびUV不活化RC-HL（比較対照）をそれぞれマウスに筋肉内接種もしくは経鼻接種し、各々のマウスの血中ウイルス中和抗体(VNA)を測定することで確認することができる。

【００６１】

血中VNAの力価は以下の方法で測定できる。すなわち、ウイルス接種マウスから調製した血清を階段希釈し、その分液をrRC-HLと混合し、インキュベーションする。その後、ウイルス血清混合液を、組織培養マイクロタイタープレートの各ウェル中でBHK細胞懸濁液と混合し、インキュベーションする。数日後、細胞変性効果を顕微鏡観察し、50%以上のウェルにおいて細胞変性効果を阻害する血清の最も高い希釈倍数の逆数として血中ウイルス中和抗体価を算出することができる。

【００６２】

一方、RC-HLΔMの非病原性は、例えばマウスにRC-HLΔMを脳内接種し、ウイルス接種後のマウスの体重変化および生残率を求めることで確認できる。

【００６３】

rRC-HLよびUV不活化RC-HLを比較対照として上記のような実験を行い、RC-HLΔMの免疫原性および病原性を検討した結果、RC-HLΔMは、筋肉内接種のみならず経鼻接種によっても血中に抗狂犬病ウイルス中和抗体を誘導しており、不活化ウイルスワクチンの接種では望めない経鼻接種による免疫誘導が可能であることが判明した（図5）。一方、RC-HLΔMは、それを大脳接種したマウスにおいて、一過性体重減少や生残率の低下などのいかなる臨床症状の異常も認められなかったことから、非病原性であり、高度に弱毒化した狂犬病ウイルスであることが確認された（図4）。

【００６４】

上述のように、Mタンパク質を外来的に補足したM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスは、M遺伝子を欠損させることにより複製能を失わせたものであるが、感染性を保持しており、感染した細胞内で抗原タンパク質を産生できる。したがって、生ウイルスワクチンとして動物に接種した場合、液性免疫のみならず細胞性免疫をも誘導することができる。一方、不活化ウイルスワクチンは、液性免疫を誘導することはできるが、感染した細胞内で抗原タンパク質を産生しないことから、細胞性免疫を誘導することはできない。以上のことから、液性免疫および細胞性免疫の両方を誘導することができるM遺伝子欠損狂犬病ウイルスは、生ウイルスワクチン株として有用・優秀であることが示されている。

【００６５】

また、M遺伝子欠損狂犬病ウイルスRC-HLΔMは、不活化ウイルスワクチンの接種では認められなかった経鼻接種での免疫誘導能を有することが明らかになった（図5B）。この結果は、RC-HLΔMが、注射接種用のみならず、注射器を必要としない経鼻接種用や経口接種用などのワクチンとして適用できることを強く示唆している。

【００６６】

本発明者らは、本発明において、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスが、狂犬病ウイルスの新規の優れた候補ワクチンであり、また、安全かつ有効であって、注射器を使用しないワクチン接種（例えば経口接種、経鼻接種）にも利用できることを実証するものである。また、このM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスを抗原とする生ワクチンは、ウイルスの不活化工程やアジュバントの添加を必要としないことから、不活化ワクチンよりも安価に生産することができる。更に、不活化ワクチンに比べて安価であることに加えて、ワクチン接種に注射器を必要としないことから、発展途上国における狂犬病の予防にも有用である。

【００６７】

一般に、生ワクチンの剤型としては、そのままウイルス液として用いる液状製剤、あるいは、安定剤（ゼラチン、ペプトン、NZアミンなど）を添加して凍結乾燥し、添付されている溶解液（生理食塩水など）で用時溶解して用いる凍結乾燥製剤がある。長期間安定的にウイルスを保存できるという観点から、通常、凍結乾燥製剤を用時調製して用いることが多い。

【００６８】
上述のように、本発明のワクチンは、狂犬病ウイルスのMタンパク質を、人為的な発現制御システムの下で恒常的かつ細胞構成的に発現・産生することが可能な狂犬病ウイルス感受性細胞を使用する、本発明のウイルス粒子の増殖・産生法による組換え狂犬病ウイルス粒子を含むものである。
【００６９】
また本発明のワクチンは、注射接種用のみならず、経口接種用および経鼻接種用ワクチンとして用いることができるものである。
【実施例】
【００７０】
（実験例）以下、実験例により本発明を更に詳しく説明する。
【００７１】
（１）RC-HLΔMの作出
公知の組換え狂犬病ウイルスを作製するためのリバースジェネティックスの技術（N. Itoら, 2003, Microbiol. Immuno. 47:613-617）によって、弱毒化した狂犬病ウイルスであるRC-HL株由来のM遺伝子欠損ゲノムプラスミドベクターpRC-HLΔMから、外来性Mタンパク質が補足されたM遺伝子欠損狂犬病ウイルスRC-HLΔMを産生させることができた。なお、RC-HL株由来のM遺伝子欠損ゲノムプラスミドベクター（pRC-HLΔM）は、平成16年9月30日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにより受託されている（pRC-HLΔM　受託番号 FERM P-20237）。
【００７２】
以下に、M遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスの作出法を詳細に説明する。まず、PCRで増幅したM遺伝子断片をpcDNA4/TO（Invitrogen社製）にクローニングし、得られたMタンパク質発現プラスミドベクターをpRM4/TOと名付けた。
【００７３】
T7 RNAポリメラーゼを恒常的に発現するBHK (baby hamster kidney)細胞（BHK/T7-9細胞； N. Itoら, 2003, Micorbiol. Immunol. 47:613-617）（1.0×10^5 個）に、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質の各々を発現するヘルパープラスミドベクター、上記pRM4/TO（0.2 μg）、およびM遺伝子欠損狂犬病ウイルスcDNAゲノムを組み込んだプラスミドベクターpRC-HLΔM（2 μg）を通常の技術（N. Itoら, 2003, Micorbiol. Immunol. 47:613-617）を用いてコトランスフェクションした。次いで、このコトランスフェクションから4日後に細胞を継代し、pRM4/TO（0.8 μg）を再度トランスフェクションした。本発明者らは、このような細胞継代およびトランスフェクションを3日に2回の頻度で繰り返した。その結果、細胞培養上清中に、外来性Mタンパク質が補足されたM遺伝子欠損組換え狂犬病ウイルスRC-HLΔMが得られた。
【００７４】
本発明者らは、上述のようにして得たRC-HLΔMを下記のBHK/RM-23を用いた大量増殖のためのオリジナル・ストックとして保存した。
【００７５】
なお、ここで用いた細胞は、10%トリプトースリン酸ブロス（TPB）および5%ウシ胎仔血清（FCS）を添加したEagle基礎培地（MEM）を用いて培養した。
【００７６】
（２）RC-HLΔMの特徴解析（RT-PCR）
RC-HLΔMがそのゲノム中にM遺伝子を有しないことを確認するために、それぞれM遺伝子の上流および下流の遺伝子領域にアニールするポジティブセンス・プライマーおよびネガティブセンス・プライマーを用いて、RT-PCRを行った（図2A）。比較例としてrRC-HLを用いた。
【００７７】
RT-PCRは、以下のようにして行った。すなわち、ISOGEN（Nippon Gene社製、日本）を用いてRC-HLΔMのウイルス・ストックからゲノムRNAを抽出し、それを鋳型として、RC-HL

ゲノムの塩基番号2,370から2,393までの領域にアニールするポジティブセンスDetRM(+)プライマー（5' ATC ATG CAA GAT GAT TTG AAT CGC 3'）（DDBJ/EMBL/GenBank受託番号：AB009663）およびReady-To-Go You-Prime First-Strand Beads（Pharmacia社製）を用いてcDNAを合成した。次いで、このcDNAを鋳型とし、DetRM(+) プライマーおよびRC-HLゲノムの塩基番号3,491から3,514までの領域にアニールするネガティブセンスDetRM(-)プライマー（5' TTT AAG TTC CAT GTA TGA GAA CCC 3'）を用いたPCRを実施した。続いて、このRT-PCRで増幅させたM遺伝子近傍のcDNA断片をアガロースゲル電気泳動で解析することで、RC-HLΔMがM遺伝子を欠損したウイルスであるか否かを確認した。なお、PCRのTaq DNAポリメラーゼにはTakara Ex Taq（宝酒造株式会社製、日本）を用いた。

【００７８】

rRC-HLのウイルス・ストックから抽出されたRNAを鋳型として用いて上記のRT-PCRを行ったところ、完全長のM遺伝子を含む、1,147塩基対（bp）のcDNA断片が得られた（図2B、レーン3）。これとは対照的に、RC-HLΔM由来のRNAについて同一のプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、予想したとおり、より小さいサイズ（450 bp）のcDNA断片が得られた（図2B、レーン1）。逆転写（RT）段階を伴わないPCRによってはいかなる産物も得られず、このことは、上記のRT-PCRで増幅されたDNA断片がトランスフェクションに用いた完全長ゲノムプラスミドに由来するものではないことを示している（図2B、レーン2）。以上の結果より、RC-HLΔMゲノムは確かにM遺伝子欠損であることが証明された。

【００７９】

（３）RC-HLΔMの特徴解析（IFA）

RC-HLΔMが複製して子孫ウイルスを産生するか否かは、RC-HLΔMを感染させた細胞をIFAで蛍光標識することにより調べた（N. Minamotoら, 1994, Microbiol.Immunol. 38:449-55）。

【００８０】

すなわち、まず、RC-HLΔMおよびrRC-HLをM.O.I.（multiplicity of infection、感染価）0.01でマウス神経芽腫細胞株であるNA細胞に接種し、10%ウシ胎仔血清を含むEagle基礎培地中で培養した後、各々の感染細胞を2%ホルムアルデヒドで60分間、次いで100%メタノールで2分間固定した。続いて、固定した細胞に抗Nタンパク質モノクローナル抗体N-MAb 8-1を作用させ、蛍光標識した二次抗体との反応で感染細胞を蛍光標識した後に蛍光顕微鏡観察下でウイルス抗原を検出することにより、RC-HLΔMが複製し子孫ウイルスを産生しているか否かを調べた。

【００８１】

上記のようなIFAを行った結果、rRC-HLを感染させたNA細胞では、Nタンパク質は、2 dpi（days post-inoculation、接種後日数）においてフォーカスとして観察され、4 dpiにおいては広範囲で検出された（図2D、下段）。これとは対照的に、RC-HLΔMを感染させたNA細胞では、2 dpiおよび4 dpiの両方において、感染したRC-HLΔM由来の僅かのNタンパク質しか検出されず、このウイルスが感染性を保持しているものの複製能を持たないことが確認された（図2D、上段）。

【００８２】

（４）RC-HLΔMの特徴解析（ウイルス力価）

また、RC-HLΔMが複製能を有するか否かは、24ウェル組織培養プレートの各培養ウェルに単層に増殖させたBHK細胞を用いた一般的なフォーカス・アッセイでこのウイルスのウイルス力価を測定することにより確認した。このようなウイルス力価測定を行った結果、2 dpiおよび4 dpi におけるNA細胞の培養上清中におけるrRC-HLのウイルス力価は、それぞれ1.1×10^{6} FFU/mlおよび1.5×10^{8} FFU/mlであった。一方、RC-HLΔMに感染した細胞からの上清中におけるRC-HLΔMのウイルス力価は、2 dpiおよび4 dpiの両方において検出限界以下であり（$<1.0\times10^{1}$ FFU/ml）、このウイルスが複製能を有しないことが再度確認された。

【００８３】

（５）RC-HLΔMの特徴解析（ウエスタン・ブロット法）

一方、RC-HLΔMがNタンパク質またはMタンパク質を産生するか否かについては、抗Nタンパク質モノクローナル抗体N-MAb 8-1あるいは抗Mタンパク質モノクローナル抗体53-D-3-3を用いた一般的なウエスタン・ブロット法で調べた。すなわち、RC-HLΔMを感染させたNA細胞から調製した細胞全タンパク質を一般的なウエスタン・ブロット法で解析することにより、RC-HLΔM感染細胞においてNタンパク質およびMタンパク質が産生されているか否かを調べた。

【００８４】

本発明において、このような方法の実験を実施した結果を図2Cに示す。レーン1から3まではNタンパク質を検出するために抗Nタンパク質モノクローナル抗体（N-MAb）を用いた場合を表し、レーン4から6まではMタンパク質を検出するために抗Mタンパク質モノクローナル抗体（M-MAb）を用いた場合を表している。抗原としては、RC-HLΔM感染NA細胞溶解物（レーン1および4）、rRC-HL感染NA細胞溶解物（レーン2および5）、Mock感染（ウイルス感染なし）NA細胞溶解物（レーン3および6）を用いた。

【００８５】

このウエスタン・ブロット法により、Nタンパク質が、rRC-HL感染細胞においてと同様に、RC-HLΔM感染細胞においても発現していることが示された（図2C、レーン1および2）。また、RC-HLΔM感染細胞においては、Gタンパク質の発現も検出された。しかしながら、RC-HLΔM感染細胞においては、rRC-HL感染細胞においてMタンパク質が発現しているのとは異なり（図2C、レーン5）、Mタンパク質コード遺伝子の欠如のためにMタンパク質は発現していなかった（図2C、レーン4）。以上の結果から、RC-HLΔMは、それを感染させた細胞において、少なくともNタンパク質を産生しているが、Mタンパク質を産生していないことが示された。

【００８６】

（６）Mタンパク質発現細胞におけるRC-HLΔMの増殖性の検討

上述のGeneSwitch（商標）システムを用い、ミフェプリストンの添加によりMタンパク質の発現が制御可能な、RC-HL株由来Mタンパク質を持続的に発現するBHK細胞系を構築した。

【００８７】

GeneSwitch（商標）システムを用いて作出・クローニングした細胞の中から最も大量にRC-HLΔMを産生する細胞の選択するために、ミフェプリストン（10nM）存在下で、各細胞クローンにRC-HLΔMを感染させ、3日間培養してウイルスを増殖させた後に、上述のNタンパク質モノクローナル抗体N-MAb 8-1を用いたIFAを実施し、螢光顕微鏡観察下で、最も多くのウイルス・フォーカスを形成する細胞クローンを選別した。このような方法を実施して得られた、Mタンパク質の発現を人為的に制御できる狂犬病ウイルス高産生性細胞クローンをBHK/RM-23細胞と名付けた。

【００８８】

一般的なウエスタン・ブロット法およびIFAにより、BHK/RM-23細胞におけるミフェプリストン添加によるMタンパク質の発現誘導を確認した。

【００８９】

10 nMのミフェプリストン存在下および非存在下で培養したBHK/RM-23細胞について、抗Mタンパク質モノクローナル抗体を用いたウエスタン・ブロット法を行ったところ、ミフェプリストンを含有しない培地でBHK/RM-23細胞を培養した場合には、細胞におけるMタンパク質は検出されなかった（図3A、レーン1）。これとは対照的に、10 nMのミフェプリストンを含有する培地において培養した細胞では、発現したMタンパク質が検出された（図3A、レーン2）。なお、本実験には、rRC-HLを感染させたBHK細胞溶解物を陽性対照として用いた（図3A、レーン3）。

【００９０】

一方、IFAを行った結果、ミフェプリストン非存在下でMタンパク質の発現が誘導されなかった場合には、RC-HLΔMの複製ウイルスは検出されなかった（図3B、左）。これとは対照的に、ミフェプリストン存在下でMタンパク質の発現が誘導された場合には、RC-HLΔM

感染BHK/RM-23細胞は大きなフォーカスとして観察された（図3B、右）。

【００９１】

以上の結果より、ミフェプリストンの添加により、BHK/RM-23細胞からの効率的なMタンパク質発現が誘導されることが確認された。

【００９２】

BHK/RM-23細胞におけるRC-HLΔMの増殖を確認するために、RC-HLΔMをM.O.I. 0.01で細胞に接種した。培養上清中のウイルスは、3、5、7、9および11 dpiにおいて回収し、BHK細胞にて力価を測定した。その結果、培養液中の複製ウイルスの力価は、3 dpiにおいて8.6×10^2 FFU/mlであった。また、このウイルス力価は次第に増加し、11 dpiにおいては6.1×10^5 FFU/mlに達した（図3C）。

【００９３】

（７）RC-HLΔMの病原性の検討

RC-HLΔMの病原性が十分に低減されているかどうかを調べるために、RC-HLΔMおよびrRC-HLを成体BALB/cマウス（メス、６週齢）（Nihon SLC社製、日本）および哺乳BALB/cマウス（２日齢）（Nihon SLC社製、日本）の大脳内に接種した。具体的には、１群4匹のBALB/cマウスに、10倍階段希釈したRC-HLΔMまたはは rRC-HLのウイルス液を大脳内接種し、成体マウスについてはウイルス接種後の体重変化を、また、哺乳マウスについては各ウイルス接種群の50%致死量（LD_{50}）を指標として、それぞれのウイルスの病原性を比較した。

【００９４】

RC-HLΔMの病原性を判断する指標の１つとして選択した、成体マウスにおけるウイルス接種後の体重変化については、Mock接種（ウイルス接種なし）マウスを対照として用いて調べた。1群4匹の成体マウスを用いてウイルス接種後の体重を経時的に測定し、平均値±標準偏差をグラフに示した（図4A）。この結果、1.0×10^5 FFUのrRC-HLを接種した成体マウスの体重は一過性に減少したが、これとは対照的に、1.0×10^5 FFUのRC-HLΔMを接種したマウスの体重は、Mock感染マウスの体重と同様に増加し続け、マウスは狂犬病の臨床兆候を全く示さなかった（図4A）。また、一方では、臨床症状を示さなかったRC-HLΔM接種マウスの血清で抗狂犬病ウイルス抗体が検出されたことから（後述）、これらのマウスが確かにRC-HLΔMに感染したことが実証された。

【００９５】

RC-HLΔMの病原性を判断する別の指標として、哺乳マウス（２日齢）に対するRC-HLΔMの致死性について調べた。それぞれ0.1、1、10または10000 FFU のRC-HLΔMおよびrRC-HLを哺乳マウスの大脳内に接種し、接種後の生残率を測定した。その結果、rRC-HLは哺乳マウスに対して致死性の感染を引き起こした（LD_{50}=1 FFU）が、RC-HLΔMは、10000 FFUの大脳内接種後においてでさえ、哺乳マウスを死亡させなかった（図4B）。なお、図中ntは、10000 FFU のrRC-HLについて測定を行わなかったことを示す。

【００９６】

以上の結果から、RC-HLΔMが成体マウスおよび哺乳マウスに対して非病原性であることが実証された。また、これらの結果と狂犬病ウイルスがマウスやイヌなど対して広い動物宿主域を示すウイルスであることを考えあわせると、RC-HLΔMがイヌに対しても病原性を示さない非病原性のウイルスであることを強く示唆する。

【００９７】

（８）RC-HLΔMの免疫原性の検討（注射接種）

不活化していないRC-HLΔMの免疫原性と不活化した親ウイルスRC-HL株の免疫原性を比較するために、1.0×10^5 FFUのRC-HLΔMまたは同量のUV不活化RC-HL株を成体BALB/cマウス（メス、６週齢）に筋肉内接種（i.m.）した。2週間後血清を回収し、狂犬病ウイルスに対するウイルス中和抗体（VNA）力価を以下のようにして測定した。

【００９８】

すなわち、ウイルス接種マウスから調製した血清を2倍階段希釈し、56℃で30分間インキュベーションした後、その25μｌを等容量の200 $TCID_{50}$のrRC-HLと混合し、さらに37℃で1時間インキュベーションした。その後、ウイルスと血清の混合液を、96ウェル組織培

養マイクロタイタープレートの各ウェル中で100μｌのBHK細胞懸濁液（3×10^5/ml）と混合した。37℃で5日間インキュベーションした後、細胞変性効果を顕微鏡観察し、50%以上のウェルにおいて細胞変性効果を阻害する血清の最も高い希釈倍数の逆数として、血中ウイルス中和抗体価を算出した。

【００９９】

図5Aには、測定値（抗体価）の幾何平均および標準偏差を示している。図5Aから明らかなように、UV不活化RC-HLは有効なVNA力価を誘導することができなかったが（VNA力価：<8）、これとは対照的に、RC-HLΔMは、ウイルス接種マウスに16から32倍の力価の血中VNA（幾何平均：22.6）を誘導した（図5A）。

【０１００】

また、RC-HLΔMを筋肉内接種したマウスの血中抗ウイルス抗体価を、IFAによって求めた。具体的には、2倍階段希釈したウイルス接種マウスの血清をNA細胞に感染させ、上記同様のIFAを行い、NA細胞が蛍光標識された時の最大血清希釈倍数の逆数をIFA力価として算出した。その結果、RC-HLΔM接種マウスの血中IFA力価は、rRC-HLを筋肉内接種した場合に比べてわずかに低いものの、UV不活化RC-HLを筋肉内接種した場合よりも明らかに高い値を示した（図5B、左）。なお、図5Bには、得られたIFA力価（抗狂犬病ウイルス力価）の幾何平均および標準偏差を示し、図中のアスタリスク（＊）は、4匹のマウスのうち3匹のみが血清反応陽性（sero-positive）であったことを示している。

【０１０１】

以上の結果、RC-HLΔMは、成体マウスに接種した場合、不活化ウイルスに比べて明らかに高い抗原性を示すことが明らかになった。

【０１０２】

（９）RC-HLΔMの免疫原性の検討（経鼻接種）

RC-HLΔMが経鼻接種ワクチンとして有効であるかどうかを調べるために、1.0×10^5 FFUのRC-HLΔM、rRC-HL、またはUV不活化RC-HL（UV RC-HL）のそれぞれを、成体BALB/cマウス（メス、６週齢）に経鼻接種（i.n.）した。接種後14日目にマウスから血清を調製し、狂犬病ウイルスに対する血中抗体価を上記同様にIFA力価として求めた。その結果、RC-HLΔMを経鼻接種したマウスの血中IFA力価の幾何平均（538倍）は、rRC-HLを接種した場合（761倍）に比べてやや低い値であったが、RC-HLΔMが経鼻接種により抗狂犬病ウイルス抗体を効果的に誘導することが示された（図5B、右）。また、このようにRC-HLΔMの経鼻接種で誘導された抗狂犬病ウイルス抗体の力価は、このウイルスを筋肉内接種した場合に誘導された抗狂犬病ウイルス抗体の力価（IFA力価：113倍）より高かった（図5B、右）。一方、RC-HLΔMとは対照的に、UV不活化RC-HLを経鼻接種（i.n.）した場合には、抗狂犬病ウイルス抗体を誘導することはなかった（IFA力価<20）。なお、RC-HLΔMを経鼻接種したマウスの体重は減少しなかったが、rRC-HLを経鼻接種したマウスの体重は大脳内接種マウスの体重と同様に一過性に減少した（図4A参照）。以上の結果、本発明のRC-HLΔMが安全な経鼻接種ワクチンとして有効・有用であることが示された。

【図面の簡単な説明】

【０１０３】

【図１】図1は、pRC-HLΔM作出の概略図を示す。

【図２】図2Aは、rRC-HLおよびRC-HLΔMについてRT-PCRを行った際のプライマーがアニールする領域（矢印）、および増幅した遺伝子断片とそのサイズ（bp）を示した概略図である。図2Bは、RC-HLΔMがそのゲノム中にM遺伝子を有しないことをRT-PCRで確認した際のPCR増幅遺伝子断片のアガロースゲル電気泳動像である。図2Bのレーン1はRC-HLΔMを鋳型とした時、レーン2はRC-HLΔMを鋳型とし、逆転写反応を行わなかった時、およびレーン3はrRC-HLを鋳型とした時のRT-PCRによる増幅遺伝子断片である。レーンMW（Molecular Weight、分子量）は、サイズマーカーを示す。図2Cは、RC-HLΔM感染マウス神経芽腫細胞株NA細胞およびrRC-HL感染NA細胞におけるウイルスタンパク質の発現をウエスタン・ブロット法で解析した結果を示したものである。図2Cのレーン1と4はRC-HLΔM感染NA細胞、レーン2と5はrRC-HL感染NA細胞、およびレーン3と6はMock感染NA細胞のタンパク質である。N

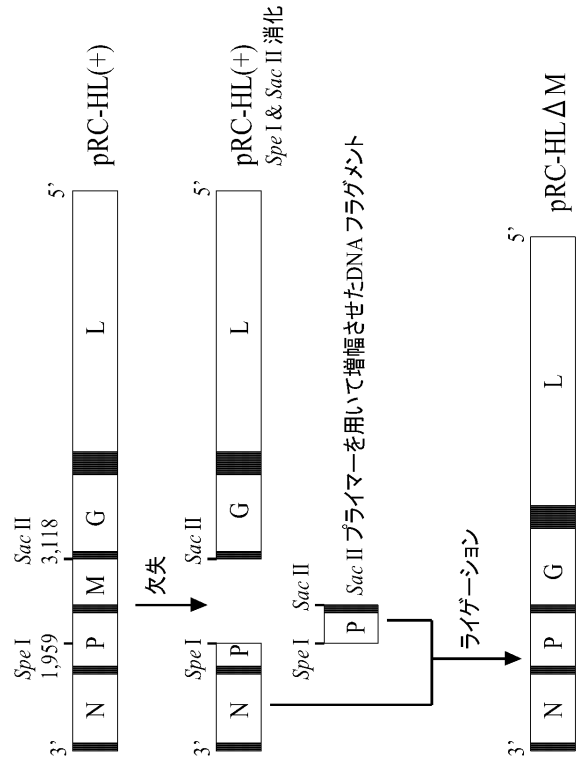
はNタンパク質、MはMタンパク質を表す。図2Dは、RC-HLΔM感染NA細胞（上段）およびrRC-HL感染NA細胞（下段）について、抗Nタンパク質モノクローン抗体（N-MAb）を用いたIFAを実施した際の細胞像を示したものである。

【図３】図3Aは、10 nMのミフェプリストン存在下または非存在下でBHK/RM-23細胞を培養し、Mタンパク質発現誘導の有無をウエスタン・ブロット法で解析した結果を示したものである。レーン1はミフェプリストン非存在下で培養したBHK/RM-23細胞、レーン2はミフェプリストン存在下で培養したBHK/RM-23細胞、およびレーン3は陽性対照としたrRC-HL感染BHK細胞である。図3Bは、ミフェプリストン存在下（右）または非存在下（左）で培養したRC-HLΔM感染BHK/RM-23細胞について、IFAを実施した際の細胞像を示したものである。図3Cは、BHK/RM-23細胞におけるRC-HLΔMの増殖曲線である。

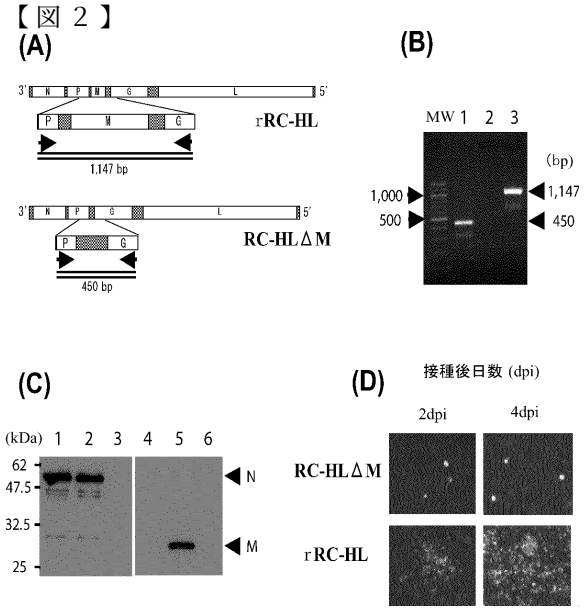
【図４】図4Aは、rRC-HLまたはRC-HLΔMを大脳内接種した成体マウスの体重変化を示したものである。図4Aにおいて、Mockは、Mock接種（ウイルス接種なし）を示す。図4Bは、rRC-HLまたはRC-HLΔMを大脳内接種した哺乳マウスの生残率を示したものである。

【図５】図5Aは、RC-HLΔM またはUV不活化RC-HLを筋肉内接種した成体マウスの血清中ウイルス中和抗体（VNA）の力価を表したグラフである。図5Bは、RC-HLΔM、rRC-HL またはUV不活化RC-HLを筋肉内接種（i.m.）または経鼻接種（i.n.）したマウスの血清中IFA力価を表したグラフである。

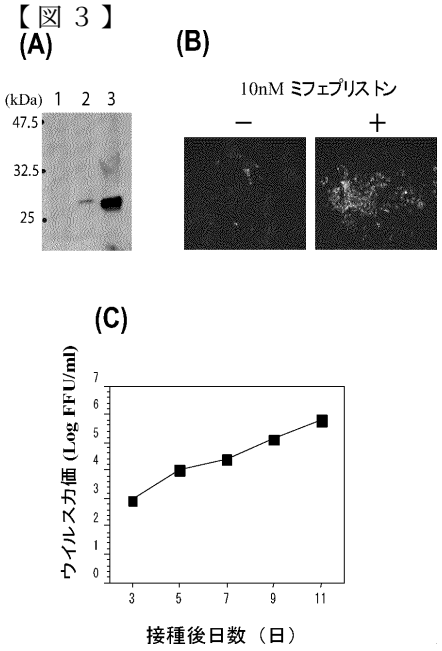
【図１】



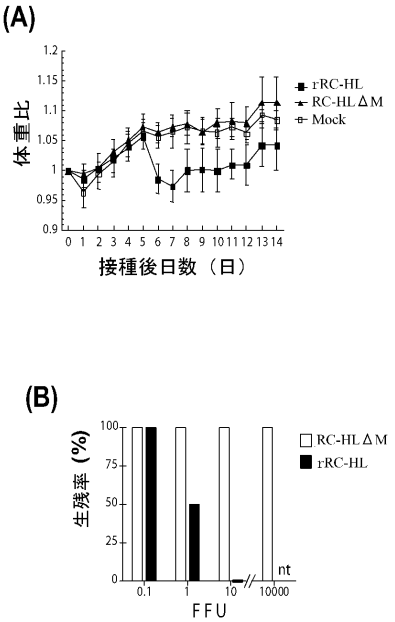
【図２】



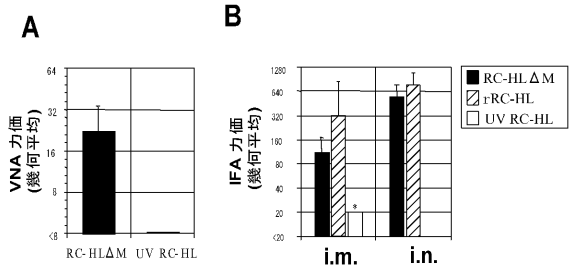
【図３】


(A)
(B)
(kDa) 1 2 3
47.5
32.5
25
10nM ミフェプリストン
−
+
(C)
ウイルス力価 (Log FFU/ml)
接種後日数（日）

【図４】


(A)
体重比
接種後日数（日）
rRC-HL
RC-HLΔM
Mock
(B)
生残率 (%)
FFU
RC-HLΔM
rRC-HL
nt

【図５】


A
B
VNA 力価
(幾何平均)
RC-HLΔM
UV RC-HL
IFA 力価
(幾何平均)
i.m.
i.n.
RC-HLΔM
rRC-HL
UV RC-HL

フロントページの続き

(74)代理人 100098327
弁理士 高松 俊雄
(72)発明者 源 宣之
岐阜県岐阜市大蔵台１８番２３号
(72)発明者 伊藤 直人
愛知県中島郡平和町前浪字上前浪１１
(72)発明者 岸 雅彦
東京都墨田区向島４丁目２６番１２号

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA04 DA02 DA20 EA04 GA11 GA27 HA20
4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 AC20 BA01 BA16 BA24 BA30
CA24 CA43 CA45
4C085 AA03 BA64 BB50 DD21 DD62 EE01 GG01 GG08 GG10